第33卷 第1期　　昆 虫 学 报　　Vol. 33, No. 1
1990年2月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Feb., 1990

蜚蠊灭菌肽的诱导及初步分离分析

张　然　陈濂生　张宗炳

（北京大学生物学系，北京）

摘要　昆虫经诱导后产生灭菌肽的研究近年来已有很大进展，有关这方面的研究工作绝大多数都是以有翅亚纲内生翅类鳞翅目(主要是蚕类)昆虫和少数双翅目昆虫为材料。本文首次以有翅亚纲外生翅类蜚蠊目的美洲蜚蠊（*Periplaneta americana* L.）为实验昆虫，用 *Escherichia coli* K_{12} strain D_{31} 作诱导源，对不同发育期、不同性别、不同成虫期的蜚蠊进行诱导后，采用含菌培养基平板测活方法，就存在个体数及能产生抗菌物质的个体数进行了初步的研究。发现成虫日龄在10天之内的雄性蜚蠊能够产生抗菌物质的个体百分比最高。抗菌物质出现的高峰期是在诱导后第三、四天。用滴滴涕和溴氰菊酯作诱导源对雄性蜚蠊的诱导实验表明，杀虫剂也能诱导蜚蠊产生抗菌物质，而且所诱导产生抗菌物质的活性强度（用抑菌圈直径表示)高于大肠杆菌所诱导的。滴滴涕和溴氰菊酯的重复诱导可提高蜚蠊产生抗菌物质个体百分比。蜚蠊经诱导后产生的抗菌物质具有广谱性，对苏云金杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌及绿脓杆菌等有较强的抗菌活性，而对大肠杆菌 D_{31}、大肠杆菌、粘质沙雷氏杆菌和溶壁微球菌等有较弱的抗菌活性。用肽类物质的指纹图谱法分离蜚蠊血淋巴抗菌物质，发现经诱导后血淋巴中确有新的肽类物质产生，该物质具抗菌活性，用 DABITC 法分析，其 N-末端氨基酸为赖氨酸。

关键词　美洲蜚蠊　抗菌肽

昆虫免疫防御系统不同于脊椎动物，它能够通过产生有抗菌作用的肽类物质来抵抗外来物质的侵袭。70年代初，Boman 等（1974）首次从美国天蚕蛹中获得抗菌肽，并确定了天蚕素 A、B 的多肽化学结构（Steiner 等，1981），昆虫免疫防御系统的研究才进入一个新的发展时期。此后，Hultmark 等(1982)、Qu 等(1982)、张双全等(1985)分别研究了美国天蚕素 D、E、F，中国柞蚕抗菌肽 P_{9B} 和 P_{9D}，中国家蚕蛹抗菌肽 CM，并测定了它们的一级结构。

研究认为，昆虫获得性免疫是非专一性的。已发现注射蛋白酶抑制剂、核酸类物质、生理盐水、3%福尔马林、紫外线杀死的大肠杆菌菌苗、大肠杆菌丙酮粉、三磷酸尿苷、小牛血清蛋白、L-亮氨酸以及用微振荡、超声波、电波或损伤等因素处理，均可产生抗菌物质，这种反应不因外界的诱导源不同而改变。

迄今为止，关于昆虫抗菌物质研究的绝大部分工作都是在有翅亚纲内生翅类的鳞翅目和双翅目昆虫中进行的。本文选择有翅亚纲外生翅类的蜚蠊目美洲蜚蠊为材料。蜚蠊繁殖力较强，喜生活于阴暗、潮湿处，在发育过程中属于不完全变态类型，没有蛹期。蜚蠊经诱导后是否也能产生抗菌物质，不同性别、不同成熟期的蜚蠊诱导产生抗菌物质的能力是否有差别，抗菌物质的化学本质及其分离方法等，是本文所报道的主要内容。

材料与方法

1. 材料：美洲蜚蠊（*Periplaneta americana* L.）由上海塘桥地段医院提供，室内饲

本文于1987年1月收到。

养。本文用于诱导的细菌是 *E. coli* K_{12} strain D_{31}，由上海生物化学研究所提供。抗菌谱实验的细菌有：大肠杆菌（*E. coli* K_{12} strain D_{31}）、巨大芽孢杆菌（*Bacillus megatherium*）、枯草杆菌（*Bacillus subtilis*）、苏芸金杆菌（*Bacillus thuringiensis*）、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）和大肠杆菌，以上皆由北京大学生物学系微生物教研室提供；绿脓杆菌（*Pseudomonas aeruginosa*）、粘质沙雷氏杆菌（*Serratia marsescens*）和溶壁微球菌（*Microcoseius lysodeiktieus*），由中国科学院微生物研究所菌种室提供。

2. 试剂：琼脂粉为日本进口分装，聚酰胺薄膜系浙江黄岩化学分析材料厂产品，DABITC(4N,N-二甲氨基偶氮苯-4'-异硫氰酸酯)、PITC(苯异硫氰酸酯)系美国 Pierce 化学公司出品，MN-P 型微晶纤维素膜(规格 20 × 20 × 0.01cm)系浙江黄岩人民化工厂产品，实验中其他试剂均为分析纯级，N-末端分析实验试剂经重新处理。

3. 诱导方法：取 40μl *E. coli* K_{12} strain D_{31} 生理盐水稀释液（O. D_{570} = 0.096)、5μlDDT* (10^{-9}g/ml) 或 DLMT**(10^{-8}g/ml) 的丙酮水溶液(丙酮：水 = 1:200)，从美洲蜚蠊腹部第 7 或 8 腹节处注入，注射处用低溶点石蜡封闭。经 DDT 或 DLMT 一次诱导后，间隔 72 小时，再注射 5μl 相同浓度的 DDT 或 DLMT 溶液，为重复诱导。

4. 生物活性检测方法：从蜚蠊腹部顶端取血淋巴 5μl 加入含菌培养基直径为 2mm 的孔中，37℃ 下倒置培养过夜，观察抑菌圈。

5. 多肽类物质指纹图谱法分离抑菌活性物质：第 I 相：电泳电极缓冲液 pH4.4，吡啶：乙酸：丙酮：水 = 50:100:375:1875 (v/v)，电压 220V，电流 14mA，功率 3W；预电泳 15 分钟，电泳 2 小时。第 II 相：层析展层溶液为吡啶：正丁醇：乙酸：水 = 40:60:12:48(v/v)，层析时间 12 小时。层析完毕后晾干，进行显色。首先喷 5% 吡啶丙酮溶液，室温干燥，然后再喷 0.5% 茚三酮丙酮溶液，暗处放置显色。

6. DABITC 方法测定 N-末端氨基酸：经指纹图谱（FPA）得到的C点样品及空白样品用 DABITC 法测 N-末端氨基酸。

结　　果

1. 不同发育阶段及不同性别蜚蠊经 *E. coli* D_{31} 诱导产生抑菌活性物质的个体数比较

雄性、雌性蜚蠊成虫及雄性、雌性若虫各 40 头，经 *E. coli* D_{31} 诱导后，每隔 24 小时取受试蜚蠊血淋巴如前述测活方法检测抑菌活性，能产生抑菌物质的个体数和存活数及其比例见表 1。

由表 1 可看出，经 *E. coli* D_{31} 诱导后，雄性蜚蠊成虫比雌性成虫及若虫能产生抑菌物质的个体百分比高，而雌性成虫与雄性若虫能产生抑菌物质的个体数量大致相当；雌性若虫经诱导后，在 120 小时内未见有抑菌活性物质产生，且大部分死亡。因此，本文以后所述试验均用雄性蜚蠊成虫为实验材料。

2. 不同成虫期的雄性蜚蠊经 *E. coli* D_{31} 诱导产生抑菌活性物质的个体数及存活数

* DDT：滴滴涕。

** DLMT：溴氰菊酯。

表 1　大肠杆菌 D_{31} 诱导产生抑菌活性物质的个体数及存活数

	成虫						若虫					
	雄性			雌性			雄性			雌性		
诱导时间（小时）	存活个数	有活性个数	(%)	存活个数	有活性个数	(%)	存活个数	有活性个数	(%)	存活个数	有活性个数	(%)
0	40	0	0	40	0	0	40	0	0	40	0	0
24	36	0	0	38	0	0	36	0	0	34	0	0
48	33	3	9.0	21	0	0	28	0	0	22	0	0
72	30	15	50	21	7	33.3	20	6	30.0	8	0	0
96	21	12	57.1	7	0	0	18	2	11.1	7	0	0
120	20	1	5.0	5	0	0	12	0	0	5	0	0

比较

取成虫日龄大于 30 天的雄性蜚蠊 20 头和成虫日龄小于或等于 10 天的雄性蜚蠊 27 头，经 *E. coli* D_{31} 诱导后，按前述方法测抑菌活性，能产生抑菌活性物质的个体数及存活个体数见表 2。

表 2　大肠杆菌 D_{31} 诱导不同成虫期蜚蠊产生抑菌活性物质的个体数及存活数

	成虫期大于 30 天			成虫期小于等于 10 天		
诱导时间（小时）	存活个数	有活性个数	(%)	存活个数	有活性个数	(%)
0	20	0	0	27	0	0
24	20	0	0	27	0	0
48	13	1	7.7	19	0	0
72	13	5	38.4	19	13	68.4
96	10	4	40.0	16	11	68.8
120	10	1	10.0	15	2	13.3

由表 2 可见，在诱导 72—96 小时，成虫日龄大于 30 天的雄性成虫存活数占 65—55%，而产生抑菌活性物质的个体数近 40%，成虫日龄小于或等于 10 天的个体，存活数为 70—59%，产生抑菌活性物质的个体数高达 68%。

由上述实验可知，不同发育阶段、不同性别及不同成虫日龄的蜚蠊经 *E. coli* D_{31} 诱导后，以雄性成虫日龄小于或等于 10 天的蜚蠊能产生抑菌活性物质的比例最大，成活数最多。

3. 不同诱导源对雄性蜚蠊成虫的诱导结果

以 DDT、DLMT 及 *E. coli* D_{31} 为诱导源，分别处理雄性成虫，持续观察 7 天，发现蜚蠊血淋巴中均有抑菌物质产生，其结果见表 3。

DDT 诱导 72 小时后，能产生抑菌物质的个体占被诱导个体为 60% 左右；DLMT 诱导为 50% 左右；而 *E. coli* D_{31} 诱导的为 70% 左右。

E. coli D_{31}、DDT 及 DLMT 诱导时，活性高峰出现在 72—96 小时之间，以后又

表 3 不同诱导源诱导蜚蠊灭菌肽的动力学关系

诱导源	*E. coli* D_{31}			DDT			DLMT		
诱导时间(小时)	存活个数	有活性个数	(%)	存活个数	有活性个数	(%)	存活个数	有活性个数	(%)
0	20	0	0	20	0	0	20	0	0
24	16	1	6.25	20	2	10.0	19	0	0
48	16	0	0	19	0	0	19	1	5.26
72	15	11	73.3	18	11	61.1	18	9	50.0
96	15	6	40.0	18	10	55.6	18	10	55.6
120	14	2	14.4	16	3	18.7	18	1	5.6
144	13	1	7.7	15	1	6.7	17	1	5.9
168	10	0	0	14	1	7.1	17	0	0

逐渐减少。由此看出，雄性蜚蠊成虫经诱导后，抑菌活性物质主要是在第三、四天产生，并且不同诱导源诱导结果基本相同。

若用 DDT 或 DLMT 重复诱导，可提高产生抑菌活性物质个体数的百分比及抑菌活性强度。DDT 重复诱导后，百分比可由 60% 增加至 75%，DLMT 重复诱导后，百分比可由 55% 增加至 80%。

4. 抗菌物质的抗菌谱

雄性蜚蠊成虫经 DDT 诱导 72 小时后，取血淋巴检测抑菌活性，进行抗菌谱实验(见图版 I)。

由图版 I 可看出，经 DDT 诱导后，雄性蜚蠊成虫血淋巴中的抑菌物质对苏芸金杆菌、巨大芽孢杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌及绿脓杆菌等有较强的抑菌活性，而对大肠

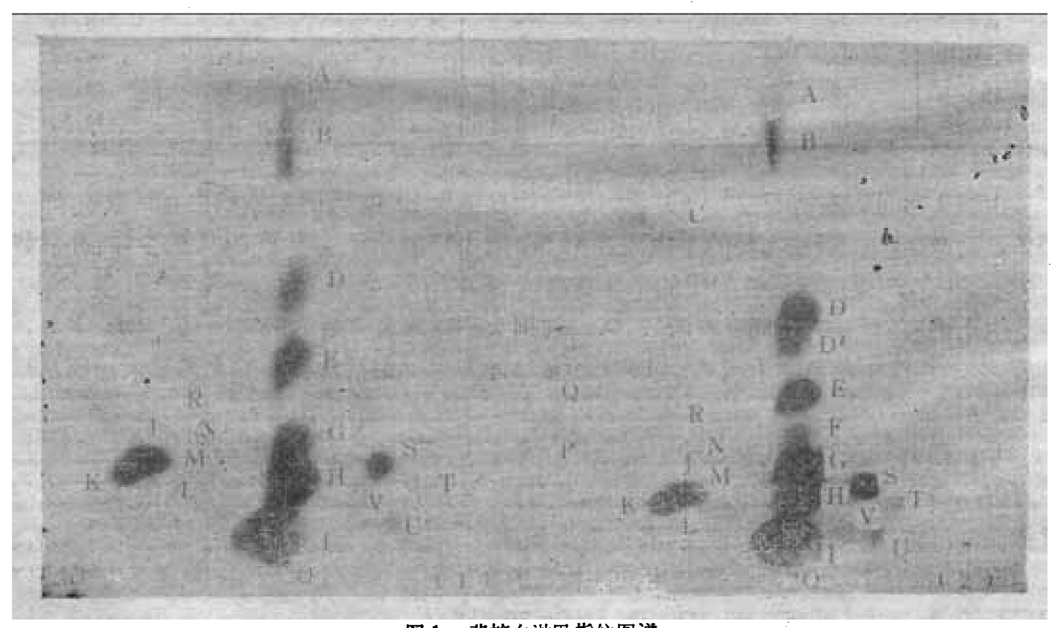


图 1 蜚蠊血淋巴指纹图谱

(1) 未诱导血淋巴 (2) DDT 诱导血淋巴

杆菌 D_{31}，大肠杆菌、粘质沙雷氏杆菌及溶壁微球菌等有较弱的抑菌活性，说明抑菌物质具广谱性。

5. 抗菌物质的指纹图谱分离分析

取未诱导的和 DDT 诱导的蜚蠊血淋巴各 20μl，点样于 MN-P 微晶纤维素膜上，进行双相电泳-层析分离分析，结果见图 1。

比较图1(1)和(2) 的肽谱可看出，经 DDT 诱导的蜚蠊血淋巴指纹图谱多出 C、F、P、Q、D′ 等五个点，说明经诱导的蜚蠊体内的确产生了能与茚三酮反应的新物质。将(2)图谱中的C点取下，经处理后，用 40μl 50％ 乙醇水溶液溶解，取 5μl 进行苏芸金杆菌平板测活。另外，在(2)图谱的空白处取与C点相同量的样品（X），同样方法处理，用50％乙醇配成比C点样品浓度稀释10倍（X － 10)、与C点浓度相同（X)、比C点浓度高10倍（X ＋ 10）的三个不同浓度的样品，与C点样品同时进行平板测活，结果见图 2。

由图 2 可以看出，X － 10 无抑菌现象，X的抑菌圈直径为 8.5mm，X ＋ 10 抑菌圈直径为 17mm，C点样品抑菌圈直径为 13mm。C点样品比X样品的抑菌圈约大 35％[(13－8.5)/13 ＝ 35％]，说明C点样品除了X样品的干扰外，还含有能够抑菌的肽类物质。

6. 指纹图谱C点样品的 N-末端基团分析

图 1 (2)指纹图谱上的C点经处理后，取 10μl 进行 DABITC 法 N-末端氨基酸分析。指纹图谱空白处样品X经同样处理作对照，经展层后，结果见图 3。

C点样品显示有二个红色斑点，经除去对照样品上存在的斑点后，与标准 DABITH-氨基酸相对照，剩余的斑点与 DABITH-Lys 位置相似。所以，C点样品可能是单一的肽类物质，其 N-末端氨基酸可能为赖氨酸。

图 2　指纹图谱C点样品对苏芸金杆菌的抑制
*50％ 乙醇溶液

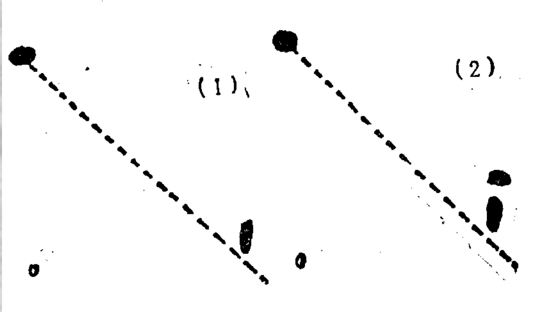


图 3　C点样品的 N-末端基团分析
(1) 对照　(2) C点样品

讨　　论

本文首次以蜚蠊目的美洲蜚蠊为材料，以细菌（*E. coli* D_{31}）及两种杀虫剂为诱导源，进行蜚蠊抗菌物质的研究。用不同日龄的雄性蜚蠊成虫进行诱导的实验表明，日龄在

10天之内的成虫比日龄大于30天的成虫产生抑菌活性物质的个体百分比高。研究不同成虫日龄昆虫免疫防御系统的差别和老年昆虫对外界刺激的不敏感性及低水平的蛋白质合成,可能有助于进一步了解衰老昆虫中蛋白质合成退化机理和衰老理论。

本文第一次用 DDT 和 DLMT 作为诱导源诱导蜚蠊产生了抗菌物质。结果表明杀虫剂也能诱导蜚蠊产生抗菌物质。采用 DDT 或 DLMT 重复诱导的方法,使蜚蠊能够产生抑菌活性物质的个体数从一次诱导的60%增加至75%,和从55%增至80%。这说明昆虫可能也象高等动物一样,存在对免疫刺激的记忆。同时, DDT 和 DLMT 等诱导蜚蠊产生抑菌物质,对杀虫剂毒理机制的研究提出了一些新的问题。

参 考 文 献

屈贤铭、李士云、吴克佐、邱雪贞、娄艳春、刘新恒、祁国荣 1985 大肠杆菌及聚肌胞核苷酸对柞蚕、家蚕蛹诱导产生溶菌酶、抗菌肽及凝集素的动力学。昆虫学报 **28**(1): 1—7。

张双全、屈贤铭、戚正武 1985 不同诱导源对柞蚕蛹血淋巴及生殖腺中抗菌物质产生的影响。生物化学杂志 **1**(4): 49—54。

Boman, H. G., Nilsson-fage I., Paul K. & Rasmuson Jr. T. 1974 Insect immunity I, Characteristics of an inducible cellfree antibacterial reaction in haemolymph of *Samia cynthia* pupae. *Infection and Immunity* **10**: 136—45.

Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich. H., Kapur, R. & Boman, H. G. 1982 Insect immunity: Isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from cecropin pupae. *Eur J. Biochem.* **127**: 207—17.

Jorosz, J. et al 1979 Comparative levels of lysozyme activity in larvae and pupae of *Galleria mellonella* after particulate and soluble materials injection. *Cytobios.* **26**(103): 203—20.

Qr X-M, Steiner, H., Engstrom, A., Bennich, H., & Boman, H. G. 1982 Insect immunity: Isolation and structure of cecropins B and D from pupae of the Chinese oak silk moth, *Antheraea pernyi*. *Eur. J Biochem.* **127**: 219—24.

Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., & Boman, H. G. 1981 Sequence and sepecificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity *Nature* **292**: 246—8.

INDUCTION AND ISOLATION OF AN ANTIBACTERIAL PEPTIDE IN *PERIPLANETA AMERICANA*

ZHANG RAN　CHEN LIEN-SHENG　J. T. CHANG

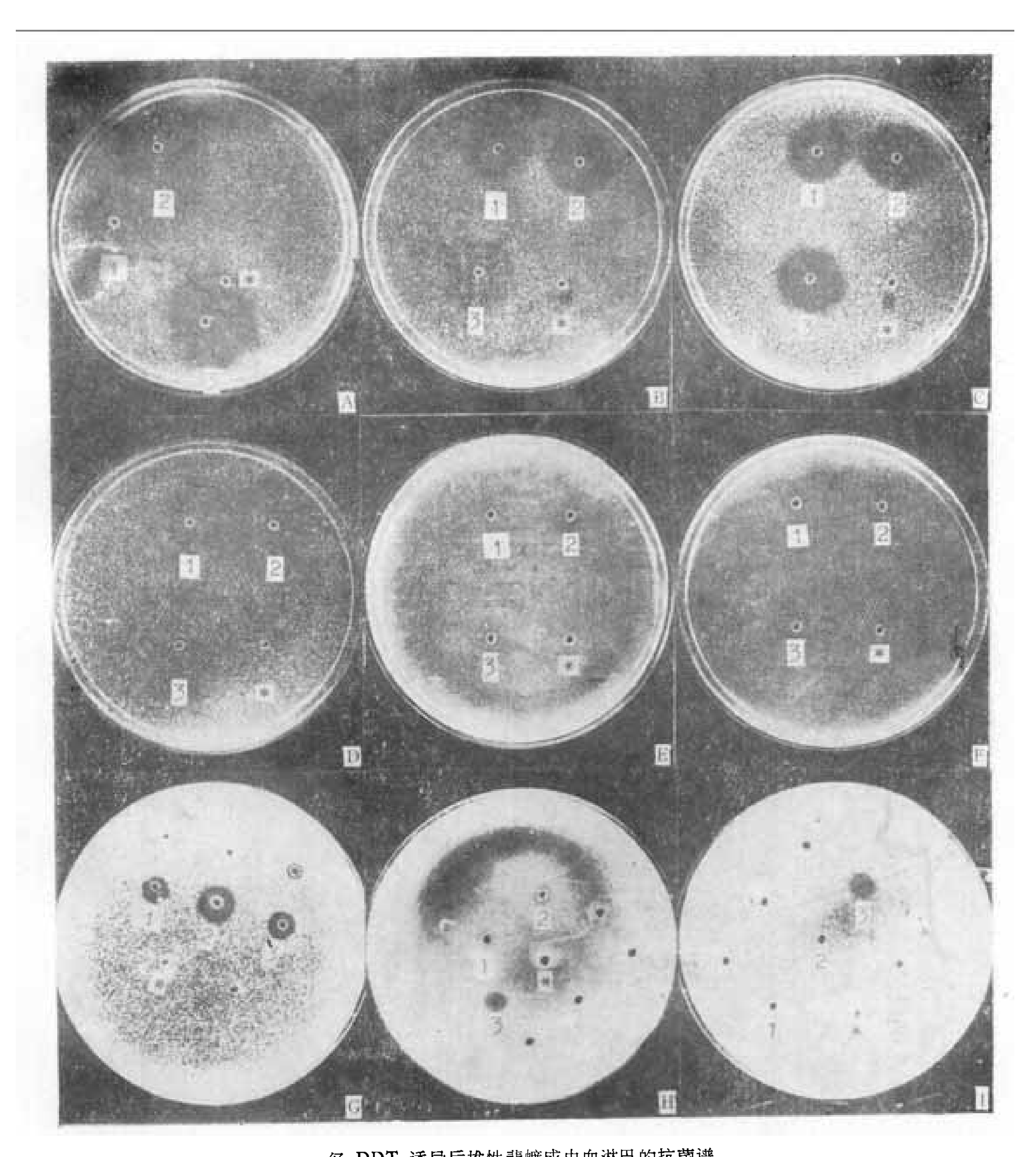
(Department of Biology, Peking University, Beijing)

Studies of insect antibacterial peptides (ABP) have made rapid progress in recent years. Until now, all the insects used in the investigations belong to Holometabola including Lepidoptera and Diptera. The present work is the first to report the induction of ABP in a hemimetabolous insect, the American cockroach *Periplaneta americana*. Studies on the influence of sex, developmental stage and age of the cockroach on its ability to respond the challenge of *Escerichia coli* strain D_{31} showed that the male adults less than 10 days after emergence possessed the greatest potential in producing ABP. The antibacterial activity was the highest at 72 to 96 hours after the treatment.

Insecticides could also induce the production of ABP in this species. Repeated treatments with DDT or deltamethrin could increase the number of individuals responding to the induction. The cockroach ABP was found to have a broad antibacterial spectrum, being highly effective against *Bacillus thuringiensis, Staphylococcus aureus, Bacillus megatherium, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa,* and less effective against *E. coli* strain D_{31}, *E. coli, Serratia marsescens,* and *Micrococseius lysodeiktieus.*

Comparing the finger prints of haemolymph peptides of untreated cockroaches and those treated with DDT, five new ninhydrin positive substances were produced in the haemolymph of the treated cockroaches. At least one of the new substances showed antibacterial activity. The N-terminal amino acid of this substance was lysine, as determined with the DABITC method.

Key words　*Periplaneta americana*——antibacterial peptide



经 DDT 诱导后雄性蜚蠊成虫血淋巴的抗菌谱

A. 苏芸金杆菌 B. 金黄色葡萄球菌 C. 巨大芽孢杆菌 D. 枯草杆菌 E. *E. coli* D_{31} F. *E. coli* G.绿脓杆菌 H. 粘质沙雷氏杆菌 I. 溶壁微球菌

1、2、3 加入血淋巴实验组 *对照组